



مطالعه افزایش بیان ژن فعال کننده پلاسمینوژن بافتی با استفاده از روش سرکوبی خاموشی ژن به کمک

پروتئین P19

مهشید امیری^۱، مختار جلالی جواران^{۲*}، پرستو احسانی^۳، رحیم حداد^۴

^۱ دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

^۲ دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

^۳ استادیار گروه بیولوژی مولکولی، انیستیتو پاستور ایران، تهران.

^۴ دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۳۰

چکیده

پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tissue plasminogen activator) انسان یکی از مهم ترین پروتئین های دارویی در درمان سکته است که در تجزیه لخته خون در مغز و رگ های خونی قلب دخالت دارد. بدین منظور روش های جدید موجود در بیوتکنولوژی کشاورزی همچون انتقال ژن به هسته و کلروپلاست برای تولید این پروتئین ارزشمند به کار گرفته شد. بیان موقت ژن در گیاهان، روشی سریع، قابل انعطاف و تکرار پذیر جهت تولید میزان بالای پروتئین های دارویی ارزشمند است. مشخص شده است که خاموشی پس از رونویسی بر میزان بیان تاثیر می گذارد. بنابراین، اثر بیان همزمان ژن سرکوب کننده خاموشی ژن P19، که توالی کد کننده آن از ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه فرنگی به دست آمده است، بر روی بیان موقت tPA در گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) واریته Xanthi مطالعه شد. برای این منظور، میزان بیان در تزریق آگروباکتریوم حاوی ناقل دوتایی بیانی pTRAC-tPA-ERH به همراه آگروباکتریوم حاوی ناقل pCAMBIA-P19 در مقایسه با میزان بیان بدست آمده از آگروباکتریوم تنها حاوی ناقل دوتایی بیانی pTRAC-tPA-ERH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از تزریق همزمان براساس آزمون الایزا (ELISA) نشان داد که میزان بیان tPA با استفاده از P19، ۱۰ $\mu\text{g/g}$ وزن تر برگ بود که این میزان بیان، حدود دو برابر زمانی بود که در تزریق از آگروباکتریوم حاوی ناقل P19 استفاده نشد. بنابراین در مقایسه با انتقال پایدار که به مدت زمان بیشتری برای تولید پروتئین موردنظر نیاز است، در انتقال موقت به ازاء تعداد برگ های قابل تزریق یک گیاه و تولید ۱۰ μg tPA در ازاء هر گرم وزن تر برگ می توان به میزان بیشتری از این پروتئین در مدت زمان کمتر از یک هفته دست یافت. در نتیجه، بنظر می رسد استفاده از بیان موقت برای بیان tPA مفید است و سطح بیان با بکارگیری سرکوب کننده خاموشی ژن کد شده توسط ویروس بهبود یافته است و به میزان بیان ۱۰ $\mu\text{g/g}$ وزن تر برگ رسیده است.

کلمات کلیدی: توتون، بیان موقت ژن، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA)، خاموشی ژن پس از رونویسی، سرکوب کننده خاموشی ژن.

مقدمه

این پروتئین باشد. کارهای ارزشمندی در زمینه تولید این پروتئین انسانی در گیاهان مختلف از جمله، خیار (Asgari *et al.*, 2014) و توتون (Hahn *et al.*, 2009; Masoumi Asl *et al.*, 2013; Goojani *et al.*, 2010) صورت گرفته است. در مطالعه Hahn *et al.* (2009) و Masoumi Asl *et al.* (2010) انتقال ژن به هسته گیاه توتون صورت گرفت ولی میزان تولید این پروتئین انسانی ارزشمند به ترتیب ۰/۰۰۱۴٪ و ۰/۰۱ mg/kg پروتئین محلول و ۰/۲۶٪ بوده است. از این رو، برای افزایش سطح بیان ژن tPA در گیاه توتون، ترادف ژنی فرم K2S این پروتئین که فقط دارای دومین کرینگل دوم و دومین سرین پروتئاز است به کلروپلاست گیاه توتون انتقال یافت (Abdoli-Nasab *et al.*, 2013). بدلیل اهمیت tPA که داروی گرانقیمت و باارزشی است، امکان تولید نه تنها به روش انتقال پایدار به گیاهان که نیاز به صرف هزینه و زمان زیادی دارد بررسی می‌گردد، بلکه به کمک سیستم بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی روشی ارزشمند در بیوتکنولوژی گیاهی است. این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده، بی‌نیاز به کشت بافت و در بافت‌های تمایز یافته قابل اجرا است. در این روش پروتئین در سطح بالا و در کوتاه‌ترین زمان با بکارگیری روش مناسب تولید می‌شود (Kapila *et al.*, 1997; Goodin *et al.*, 2002).

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی از نوع (tPA) یک آنزیم سرین پروتئاز است که می‌تواند پلاسمینوژن را به فرم فعال آن، پلاسمین، تبدیل کند و پلاسمین می‌تواند لخته خونی را با شکستن فیبرین در عروق خرد کند. بنابراین، tPA برای درمان انسداد قلبی، عروقی و مغزی استفاده می‌گردد. (Rouf *et al.*, 1996).

پروتئین tPA در بافت‌های مختلف انسان و حیوانات یافت می‌شود. برای تولید طبیعی tPA، بافت‌هایی همچون ملانوم، اپی تلیال، فیبروبلاست و اندوتلیال از طریق روش کشت بافت استفاده شده و tPA از این بافت‌ها خالص گردیده است (Electricwala & Atkinson, 1985; Griffiths & Electricwala, 1987; Levin *et al.*, 1997). علاوه بر این، از تکنولوژی DNA نوترکیب می‌توان برای تولید tPA مصنوعی استفاده نمود (Rouf *et al.*, 1996). تا کنون، پروتئین tPA در سلول‌های L موش (Browne *et al.*, 1985)، لاین‌های سلولی ملانومای بوئز^۱ (Dodd *et al.*, 1986)، لاین‌های سلولی پستانداران (Jalanko *et al.*, 1990)، اشریشیاکلی (*E. coli*) (Obukowicz *et al.*, 1990)، سلول‌های تخمدان هامستر چینی (et al., 1990) (CHO) (Fann *et al.*, 2000) و لیشمانیا (Soleimani *et al.*, 2006) تولید شده است.

تولید tPA در گیاهان به کمک زراعت مولکولی^۲ می‌تواند راه مفیدی برای تولید تجاری

¹ Bowes melanoma cell line

² Molecular Farming

کنند. ژن ویروسی که پروتئین P19 را کد می‌کند از ویروس کوتولگی بوته انبوه گوجه فرنگی^۶ (TBSV) به دست آمده و به عنوان یک ژن موثر در سرکوبی سیستم خاموشی شناخته شده است (Omar, 2013).

مطالعات نشان داده‌اند که بیان پروتئین هترولوگ توسط سیستم بیان موقت توسط آگروباکتریوم می‌تواند در حضور سرکوب کننده خاموشی ژن افزایش یابد. گزارشات نشان داده‌اند که سطح بیان پروتئین فلورسنت سبز^۷ (GFP) در حضور P19 نسبت به عدم حضور سرکوب کننده خاموشی در گیاهان تراریخت بدست آمده از انتقال پایدار به میزان قابل ملاحظه‌ای بالاتر بود (Voinnet *et al.*, 2003). یافته مشابهی نیز نشان داد که به کمک بیان موقت و با استفاده از راه‌انداز 35S ویروس موزائیک کلم گل (35S CaMV) میزان تولید GFP در حضور ژن سرکوب کننده خاموشی P19، ۱۰ تا ۲۵ برابر افزایش یافت (Lindbo, 2007). در مطالعه Liu and Kearney (2010) در عدم حضور P19 میزان بیان GFP ناچیز گزارش گردید (Liu & Kearney, 2010). به نظر می‌رسد P19 بیان پروتئین‌های نو ترکیب مختلف از قبیل پروتئین‌های گزارشگر، آنتی بادی، پروتئین‌هایی با هدف تولید واکسن و پروتئین‌های دارویی دیگر را با میزان‌های متفاوت (۵-۱۰۰ برابر) افزایش می‌دهد (Lindbo, 2007; Garabagi *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای Wroblewski *et al.* (2005) نشان دادند

خاموشی ژن پس از رونویسی^۱ (PTGS) به عنوان یکی از عوامل محدود کننده است که سطح بیان پروتئین را در گیاهان تحت تاثیر قرار می‌دهد (Omar, 2013). دو مکانیسم اصلی خاموشی ژن در گیاهان وجود دارد: مسیرهای خاموشی مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک (siRNA) و میکرو RNA^۲ (miRNA) (Carthew & Sontheimer, 2009)، که در مجموع به عنوان RNA مداخله‌گر^۳ (RNAi) اشاره شده است. به دلیل اشتراک چند آنزیم کلیدی، شباهت زیادی از نظر مکانیسم عمل در دو سیستم (siRNA و miRNA) به چشم می‌خورد (Brodersen & Voinnet, 2006). هر دو سیستم توسط یک مجموعه شناخته شده به عنوان مجموعه القاء کننده خاموشی RNA^۴ (RISC)، اسید نوکلئیک هدف (RNA ویروسی، DNA ویروسی، mRNA ژن تراریخت و mRNA درون-زاد) خود را شناسایی می‌کنند. عامل RISC دارای RNA تک رشته مکمل برای هدف خود می‌باشد که به محض اتصال مسدود یا تخریب می‌شود (Garabagi *et al.*, 2012).

فرایند PTGS به عنوان یک سیستم ایمنی تطبیقی سرکوب کننده ویروس‌ها و به عنوان یک استراتژی ضد دفاعی عمل می‌کند و بسیاری از ویروس‌های گیاهی به گونه‌ای پروتئین‌ها را تغییر می‌دهند که مراحل مختلف مکانیسم را سرکوب

¹ Post-transcriptional gene silencing

² Small interfering RNA

³ Micro-RNA

⁴ Interfering RNA

⁵ RNA-induced silencing complex

⁶ Tomato bushy stunt virus

⁷ Green fluorescent protein

غیراختصاصی کاهش می‌دهد و پاسخ خاموشی را از طریق تداخل در اتصال siRNA به RISC سرکوب می‌کند (Hsieh et al., 2009).

هدف اصلی از مطالعه حاضر بررسی و ارزیابی اثر سرکوب‌کننده خاموشی ژن P19 بدست آمده از TBSV برای تولید tPA به کمک ناقل بیانی pTRAc با استفاده از تکنیک اگرواینجکشن^۱ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از توتون (*N. tabacum*) واریته Xanthi استفاده شد. بذرهاى گیاه پس از شستشو در گلدان‌های پلاستیکی کشت گردیدند و در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۳±۲ پرورش داده شدند.

سویه‌های باکتری: از باکتری *Escherichia coli* سویه DH5a (موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس)، *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 حاوی پلاسمید کمکی pMP90RK و *A. tumefaciens* حاوی pCAMBIA 1304 دارنده ژن P19 (اهدایی توسط دکتر احسانی، گروه بیولوژی مولکولی، انیستیتو پاستور) استفاده گردید.

ناقل‌ها: در این مطالعه ناقل pTZ57R/T و ناقل بیانی pTRAc-ERH (اهدایی R. Fischer و S. Schillberg)، گروه زیست مولکولی و بوم

که کاربرد پروتئین P19 سبب افزایش بیان GFP در گیاه *N. benthamiana* گردید در حالی که افزایشی در میزان بیان ژن GUS مشاهده نشد و باتوجه به پایداری کمتر ژن GFP در مقایسه با ژن GUS، بیان همزمان ژن سرکوب‌کننده خاموشی را سبب افزایش سطح بیان یا پایایی پروتئین‌ها بخصوص پروتئین‌هایی با پایداری کم دانستند. همچنین در همین مطالعه، هیچگونه افزایشی در بیان پروتئین GFP و GUS در گیاه *lettuce L. serriola* با کاربرد همزمان سرکوب‌کننده خاموشی مشاهده نشد و دلیل آن ژنوتیپ گیاه ذکر گردید (Wroblewski et al., 2005). در مطالعه Bhaskar et al (2009) بر روی سیب‌زمینی، سویه *Agrobacterium* را بر میزان افزایش بیان به کمک سرکوب‌کننده خاموشی مؤثر دانستند و گزارش نمودند که کاربرد همزمان سرکوب‌کننده خاموشی P19 در سویه GV3101 سبب افزایش بیان گردید در صورتیکه کاربرد آن به همراه LBA4404 تفاوتی در سطح بیان نشان نداد (Bhaskar et al., 2009).

پروتئین P19 یک پروتئین چند منظوره است که به عنوان یک دایمر فعال هم در سیتوزول و هم در هسته قرار دارد (Park et al., 2004) و قادر به اتصال به مولکول‌های siRNA و miRNA به صورت غیراختصاصی می‌باشد (Dunoyer et al., 2004). از آنجایی که سطح siRNA مشتق شده از ویروس در گیاهان در پاسخ به آلودگی افزایش می‌یابد، P19 میزان siRNA دورشته‌ای آزاد را از طریق اتصال

¹ Agroinjection

همسانه‌سازی ژن *tPA*

به منظور تکثیر و همسانه‌سازی ژن *tPA* در ناقل دوگانه pTRAc-ERH، ابتدا محصول PCR ژن *tPA* حاصل از ناقل pBI-tPA-KDEL (Goojani *et al.*, 2013) مستقیم در ناقل T/A (ناقل pTZ57R/T) همسانه‌سازی گردید (MA1). جهت آزمون صحت کلون تولید شده، PCR با آغازگرهای اختصاصی (PF1 و PR1) انجام شد. جهت انتقال ناقل مورد نظر به درون سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* از روش استاندارد شوک حرارتی (Sambrook & Russell, 2001) استفاده شد. پس از استخراج پلاسمید (شرکت Thermo) به روش Miniprep (Sambrook & Russell, 2001)، شناسایی کلون‌های مثبت (کشت‌های حاوی کلنی‌هایی که پلاسمید آنها دارای ژن بود اصطلاح کلونی‌های مثبت داده شد) و تأیید صحت توالی قطعه مربوطه، با استفاده از هضم آنزیمی (با آنزیم‌های *NotI* و *NcoI*)، قطعه ژنی مورد نظر از روی ژل آگاروز جدا شده و با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA (شرکت Thermo) تخلیص گردید.

شناسی کاربردی موسسه فرانهورفر، آخن، آلمان) برای همسانه‌سازی و بیان ژن *tPA* به کار برده شد. ناقل بیانی pTRAc-ERH دارای راه‌انداز قوی و توالی تنظیمی افزایش‌دهنده رونویسی و ترجمه می‌باشد که عبارتند از: راه‌انداز 35S CaMV به همراه ناحیه افزایش‌دهنده مضاعف رونویسی^۱، ناحیه 5' رمزخوانی نشده کالکون سنتاز (CHS)، سیگنال پلی آدنیلاسیون CaMV 35S (pA35S) و دو نسخه از ناحیه اتصال به داربست^۲ (SAR) بدست آمده از طرفین ناقل بیانی Rb7 توتون. ناقل بیانی PTRAc-ERH همچنین حاوی پپتید نشانه بدست آمده از توالی ژن زنجیر سنگین mAb24 موش پس از بهینه‌سازی کدون‌ها براساس گیاه، و توالی هیستیدینی و توالی مربوط به نگهداری در شبکه آندوپلاسمی (ER) است (شکل ۱).

آغازگر: آغازگرهای مناسب ژن *tPA* با توجه به توالی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *NcoI* و *NotI* در ناقل pTRAc-ERH و توالی‌های کناری ژن *tPA* طراحی گردیدند که توالی آغازگرها عبارتند از:
آغازگر پیشرو (PF1):

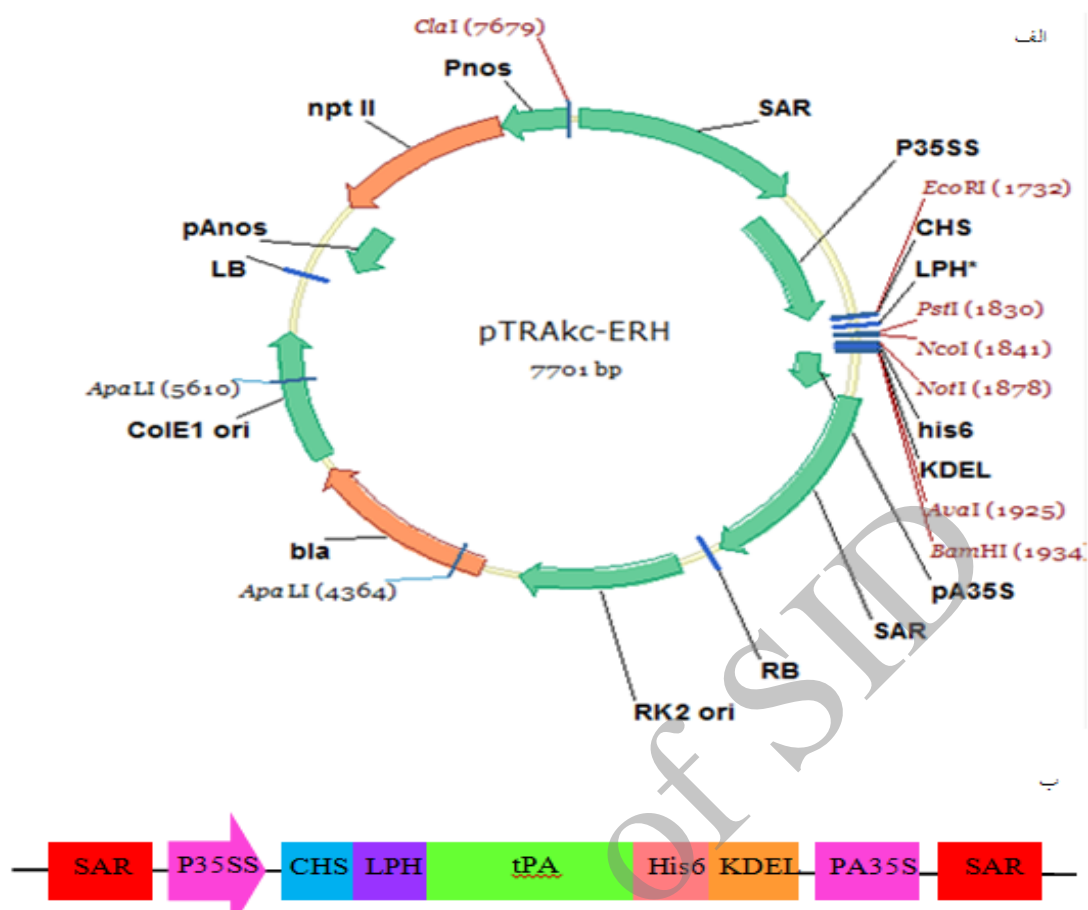
5'-
ATATTCCATGGATGCAATGAAGAGA
GG-3'

آغازگر معکوس (PR1):

5'-
ATAAGAATGCGGCCCGGTCGCAT
GTTGTCA-3'

¹ Duplicated transcriptional enhancer

² Scaffold attachment region



شکل ۱- نمایش شماتیک ناقل pTRAc-ERH و سازه (pTRAc-tPA-ERH) MA2. الف: ناقل pTRAc-ERH و جایگاه آنزیم های برشی: P35SS: راه انداز 35S CaMV به همراه افزایش دهنده مضاعف شده نسخه برداری، CHS: 5'UTR: CHS، ژن کالکون سنتاز، LPH: توالی پپتید نشانه بدست آمده از توالی ژن زنجیر سنگین mAb24 موش پس از بهینه سازی کدون ها براساس گیاه، his6: توالی حاوی 6 اسید آمینه هیستیدین، KDEL: توالی نشانه نگهداری در شبکه آندوپلاسمی، pA35S: سیگنال چند آدنیله شدن CaMV 35S، SAR: ناحیه اتصال به داربست در ژن Rb7، RK2ori: ناحیه همانندسازی در اگروباکتریوم، bla: ژن bla مقاوم به آمپی سیلین و کربن سیلین، ColE1ori: منشا همانندسازی در *E. coli*، npt II: ژن npt II مقاوم به کانامایسین، Pnos و pAnos: راه انداز و خاتمه دهنده ژن نوپالین سنتاز؛ ب: سازه (pTRAc-tPA-ERH) MA2.

Figure 1- Schematic overview of the pTRAc-ERH and MA2 construct (pTRAc-tPA-ERH). a: pTRAc-ERH vector with the restriction enzyme site: P35SS: CaMV 35S promoter with duplicated transcriptional enhancer, CHS: chalcone synthase 5'-untranslated region, LPH: plant codon optimized leader sequence derived from the murine heavy chain of the mAb24, his6: sequence with 6 histidine, KDEL: Endoplasmic reticulum retention signal, pA35S: CaMV 35S polyadenylation signal, SAR: scaffold attachment region of the tobacco Rb7 gene, RK2ori: origin of replication for *Agrobacterium tumefaciens*, bla: ampicillin / carbenicillin-resistance bla gene, ColE1ori: origin of replication for *E. coli*, nptII: kanamycin resistance gene, pAnos and Pnos: nopaline synthase gene promoter and terminator. b: MA2 construct (pTRAc-tPA-ERH).

Colony با استفاده از آزمون‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی (PF1, PR1) انجام شد و از اگروباکتریوم حاوی ناقل pTRAc-ERH به عنوان کنترل در تراریختی استفاده شد.

آلوده سازی توتون با اگروباکتریوم حاوی سازه هدف (اگرواینجکشن)

اگروباکتریوم حاوی سازه مورد نظر در محیط کشت مایع لوریا برتانی^۱ (LB) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (25µg/µl)، جتتامایسین (25µg/µl)، ریفامپسین (100µg/µl) و کاربنی سلین (100µg/µl) در دمای ۲۸°C به مدت ۱۸ ساعت کشت شد. سپس کشت‌ها با سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه با شتاب ۵۰۰۰ g رسوب داده شدند و در محیط مخصوص تلقیح (pH: ۵/۵) حاوی نمک‌های محیط MS (۰/۵X)، ویتامین‌های محیط MS (۱X)، بنزیل آمینوپورین^۲ (BAP) (۰/۰۰۱mg/ml) و استوسرینگون (۲۰۰µM) تا رسیدن به OD600 ۰/۳ رقیق شدند. به منظور بررسی اثر سرکوبی خاموشی ژن پس از رونویسی، قبل از تزریق، میزان و رقت برابر (OD- ۰/۳ 600) از اگروباکتریوم حاوی ناقل MA2 (pTRAc-tPA-ERH) و ناقل حاوی ژن P19 (pCAMBIA-P19) با یکدیگر مخلوط شدند و تیمار tPA-P19 آماده آزمون گردید. همچنین تیمار اگروباکتریوم حاوی ناقل فاقد ژن tPA به عنوان کنترل (Wt) و تیمار اگروباکتریوم حاوی

به منظور همسانه‌سازی ژن tPA در ناقل بیانی pTRAc-ERH، ناقل مورد نظر با استفاده از همان آنزیم‌های برشی (NotI و NcoI) هضم گردیده و پس از تخلیص به کمک کیت خالص‌سازی DNA (شرکت Thermo)، جهت تهیه سازه و انجام واکنش اتصال آماده گردید. ژن tPA توسط آنزیم لیگاز T4 در ناقل pTRAc-ERH خطی درج شد. ساختار تهیه شده pTRAc-tPA-ERH (MA2) به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α با استفاده از روش استاندارد شوک حرارتی معرفی گردید (Sambrook & Russell, 2001). کلون‌های تراریخت باکتریایی در محیط انتخابی (حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین) شناسایی و انتخاب گردیدند. صحت همسانه‌سازی با استفاده از هضم آنزیمی و PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن tPA صورت پذیرفت.

تراریختی اگروباکتریوم

پس از تأیید نهائی، انتقال ناقل MA2 به باکتری *A. tumefaciens* با روش استاندارد ذوب و انجماد صورت گرفت (Sambrook & Russell, 2001). سلول‌های تراریخت حاوی ژن مورد نظر در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (25 µg/µl)، جتتامایسین (25 µg/µl)، ریفامپسین (100µg/µl) و کاربنی سلین (100µg/µl) در دمای ۲۸°C کشت و پس از ۳ روز کلنی‌ها مشاهده شدند. تأیید تراریختی

¹ Luria Bertani

² Benzylaminopurine

معادله بدست آمده معنی‌دار بود. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی با استفاده از نرم افزار SAS انجام و قبل از انجام تجزیه واریانس نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مقایسات میانگین از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار^۲ (LSD=۰/۰۱۸) در سطح یک درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

همسانه‌سازی ژن tPA و تهیه سازه هدف

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود قطعات بدست آمده از تکثیر پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های مثبت حدود ۱۷۰۰ جفت باز است که اندازه این قطعه ژنی برابر با کنترل مثبت، پلاسمید حاوی ژن، نیز می‌باشد و تأییدکننده درج ژن tPA در سازه است. نتایج بدست آمده با نتایج سایر مطالعات که قطعه ژنی مورد انتظار برای ژن tPA را حدود ۱۷۰۰ جفت باز مشخص کرده است مشابهت دارد (Masoumi, Asl et al., 2010; Goojani et al., 2013). همچنین نتایج توالی‌یابی با آغازگرهای M13 واقع بر ناقل و آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن، مشابهت با توالی ژن tPA را نشان داد.

جهت تأیید درج ژن tPA در MA2 (pTRAc-tPA-ERH)، از واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی استفاده گردید (شکل ۳). قطعه تکثیر شده در کنترل مثبت در حدود ۱۷۰۰ جفت باز است و تکثیر قطعه DNA با این اندازه

تنها سازه ژنی tPA به عنوان تیمار tPA در نظر گرفته شد. برگ‌های گیاهان (*N. tabacum*) در مرحله ۶-۸ برگگی توسط سرنگ بدون سوزن تزریق شدند و بمدت ۴ روز در گلخانه با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۳±۲ نگهداری شدند.

بررسی بیان ژن tPA

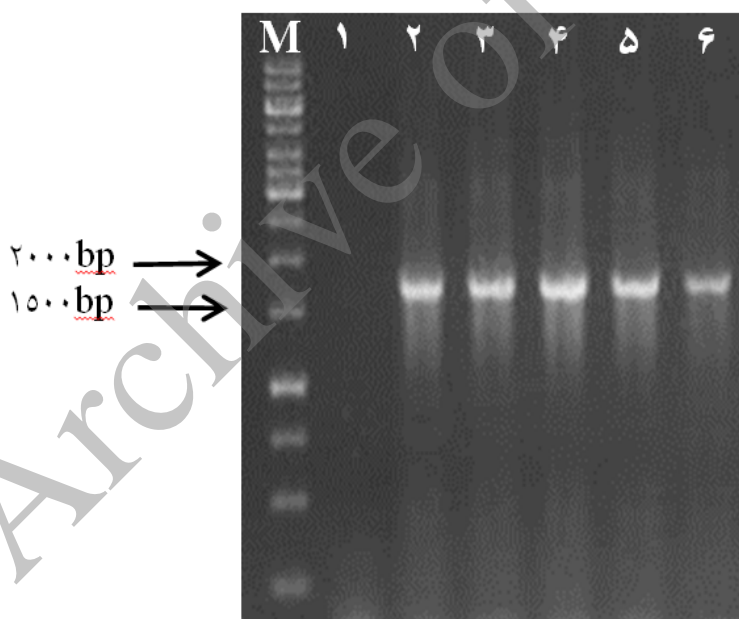
به منظور بررسی و ارزیابی اثر P19 بر بیان ژن tPA از آزمون الایزا (ELISA^۱) استفاده گردید. بدین منظور ۴۵ نانوگرم از پروتئین استخراج شده از پهنک برگ‌های گیاهان تراریخت و غیرتراریخت (کنترل منفی) بر اساس روش Guy در این آزمون مورد استفاده قرار گرفت (Guy et al., 1992). آزمون الایزا به روش غیرمستقیم (Engvall & Perlmann, 1971) با استفاده از آنتی‌بادی اولیه پلی‌کلونال tPA تولید شده در خرگوش (Abcam، ایالات متحده آمریکا) و آنتی‌بادی ثانویه Goat anti Rabbit IgGHRP conjugate (SC 2030، ایالات متحده آمریکا) با تغییرات جزئی (Abdoli-Nasab et al., 2013) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار صورت گرفت. سپس میزان جذب نوری در ۴۵۰nm توسط دستگاه ELISA-Reader (BioTek, USA) خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های tPA تجاری (Alteplase) برای کمی‌سازی پروتئین tPA مورد استفاده قرار گرفت و ضریب رگرسیون

² Least Significant Difference (LSD)

¹ Enzyme-linked immune sorbent assay

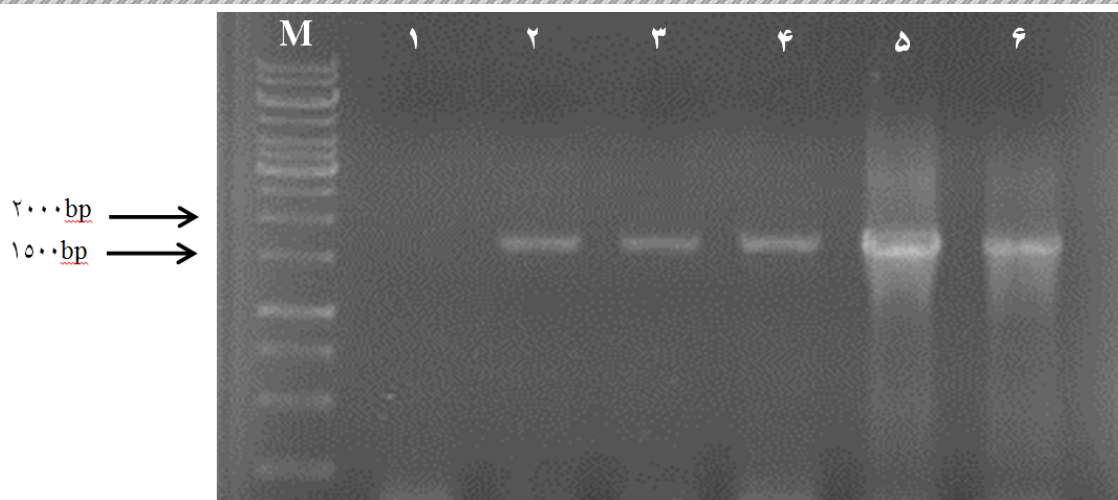
۷۷۰۰ (مربوط به ناقل) و ۱۷۰۰ جفت (مربوط به ژن *tPA*) بازی دیده می‌شود که بیان‌کننده تأیید درج ژن در MA2 است. در آخرین مرحله، MA2 به آگروباکتریوم انتقال یافت و حضور ژن *tPA* در کلنی‌های مثبت از طریق آزمون Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی تأیید شد (شکل ۵). همچنان که انتظار می‌رود قطعه ژنی ۱۷۰۰ جفت بازی قابل دیدن است و نشان دهنده این است که MA2 حاوی ژن *tPA* با موفقیت به آگروباکتریوم انتقال یافته است.

مورد انتظار در محصول PCR حاصل از پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های مثبت، مبین درج صحیح ژن در این کلنی‌هاست. آزمایش بعدی که برای اطمینان از حضور ژن *tPA* در MA2 صورت پذیرفت، هضم با آنزیم‌های *NcoI* و *NotI* (شکل ۴) می‌باشد. ناقل گیاهی pTRAC-ERH حدود ۷۷۰۰ جفت باز بوده (Maclean *et al.*, 2007) و انتظار می‌رود وقتی ژن *tPA* که حدود ۱۷۰۰ جفت باز است، در این ناقل درج می‌گردد اندازه نهائی ناقل MA2 حدود ۹۵۰۰ جفت باز می‌شود که قابل مشاهده در شکل می‌باشد. پس از هضم MA2، دو قطعه ژنی حدود



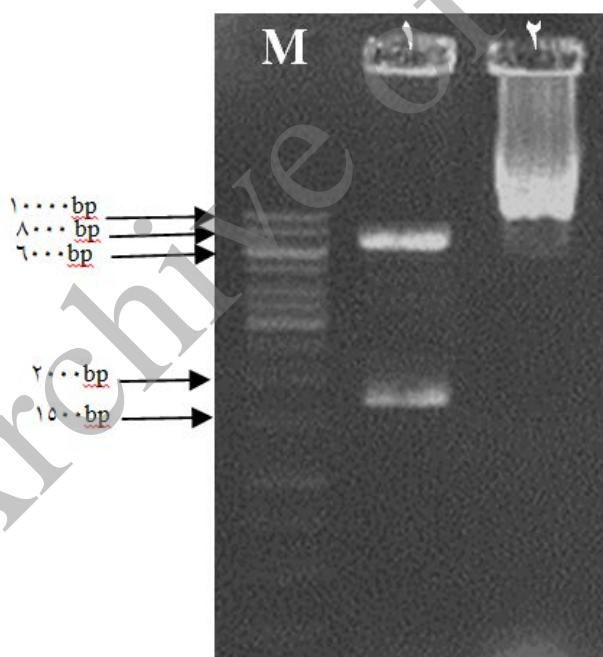
شکل ۲- محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بر روی سازه حاصل از واکنش اتصال ناقل pTZ57R/T و ژن *tPA* چاهک M: نشانگر مولکولی ۱ kb GeneRuler (Fermentas)، چاهک ۱: کنترل منفی (آب به عنوان الگو)، چاهک ۲: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن *tPA*)، چاهک‌های ۳-۶: محصولات PCR بدست آمده از پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های مثبت.

Figure 2- PCR products using the specific primers on the construct from the ligation reaction of pTZ57R/T and *tPA*. M: 1kb standard GeneRuler (Fermentas) Ladder, 1: negative control (water as template), 2: Positive control (plasmid containing *tPA* gene), 3-6: PCR products of extracted plasmid from positive colonies.



شکل ۳- محصول PCR ژن *tPA* به دست آمده از ناقل بیانی pTRAc-ERH با آغازگرهای اختصاصی بر روی ژل ۱٪ آگارز. چاهک M: نشانگر مولکولی ۱kb GeneRuler (Fermentas)، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن *tPA*)، چاهک‌های ۳-۶: محصولات بدست آمده از تکثیر ژن *tPA* در ناقل بیانی pTRAc-ERH.

Figure 3- The PCR amplification from expression vector pTRAc-ERH with specific primers on the 1% Agarose gel. M: 1kb standard GeneRuler (Fermentas) Ladder, 1: negative control, 2: Positive control (vector containing *tPA* gene), 3-6: products from amplified *tPA* gene in expression vector pTRAc-ERH.



شکل ۴- هضم ناقل pTRAc-ERH حاوی ژن با آنزیم‌های *Nco I* و *Not I*. چاهک M: نشانگر مولکولی ۱kb GeneRuler (Fermentas)، چاهک ۱: محصول واکنش هضم آنزیمی، چاهک ۲: پلاسمید برش نخورده.

Figure 4- Digestion of pTRAc-ERH vector containing *tPA* with *NcoI* and *Not I* enzymes. M: 1kb standard GeneRuler (Fermentas) Ladder, 1: Product of enzymatic digestion reaction, 2: undigested Vector.

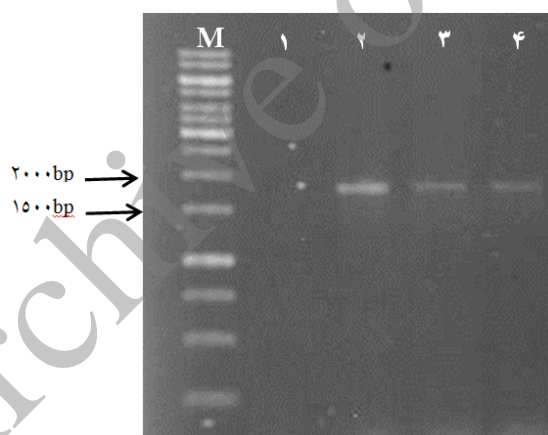
بررسی بیان ژن tPA

سطح بیان پروتئین tPA توسط ناقل بیانی (MA2) در حضور و عدم حضور ناقل حاوی ژن سرکوب‌کننده P19 به روش آزمون الایزا (ELISA) به منظور بررسی اثر P19 بر میزان بیان مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. بمنظور کمی‌سازی بیان توسط آزمون الایزا (ELISA)، از آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال tPA استفاده شد و نمودار استاندارد دقیقی از پروتئین خالص tPA (آلتپلاز) برای محاسبه سطح بیان tPA رسم گردید. میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر در هر یک از تیمارها با سه تکرار اندازه‌گیری شد. پس از تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت معنی‌دار، تفاوت معنی‌دار بین میانگین میزان جذب پروتئین در بین تیمارها مشاهده شد (شکل ۶). نتایج حاصل از آزمون الایزا (ELISA) نشان داد بین کنترل منفی (تزریق با آگروباکتریوم حاوی ناقل فاقد ژن) و دو تیمار دیگر که حاوی ژن tPA بودند تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد وجود داشت. هم‌چنین، دو تیمار P19+tPA و tPA به تنهایی اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد نشان دادند. با توجه به نمودار رسم شده در شکل ۶ می‌توان به مؤثر بودن سرکوب‌کننده خاموشی ژن P19 در افزایش میزان بیان tPA در گیاه توتون (N. tabacum واریته Xanthi) پی برد. تنها تفاوت بین این دو تیمار حضور آگروباکتریوم حاوی P19 بود، در تزریق همزمان آگروباکتریوم حاوی

P19 همراه با آگروباکتریوم دارای سازه حاوی ژن tPA، سطح بیان به میزان چشمگیری نسبت به تزریق تنهایی سازه هدف افزایش یافت. وقتی آگروباکتریوم حاوی ژن به تنهایی به گیاه تزریق شد میزان بیان tPA حدود ۰/۷۴٪ بود در حالیکه تزریق آگروباکتریوم حاوی ژن tPA به همراه آگروباکتریوم حاوی P19 میزان بیان tPA را تقریباً دو برابر افزایش داده و میزان بیان به ۱/۳۶٪ میزان کل پروتئین محلول و ۱۰ μg/g وزن تر برگ رسید. در صورتیکه میزان بیان tPA در توتون در مطالعات Hahn et al (2009) حدود ۰/۰۱۴٪ میزان کل پروتئین محلول و Masoumi et al (2010) ۰/۰۱-۰/۲۶ میلی گرم در هر کیلوگرم وزن تر برگ در انتقال ژن به هسته بود و در مطالعه Abdoli-Nasab et al (2013) میزان بیان tPA زمانیکه به کلروپلاست انتقال یافت ۱٪ میزان کل پروتئین محلول بود. با مقایسه میزان بیان می‌توان به نقش مؤثر P19 در خاموشی ژن و افزایش میزان بیان پی برد. از طرفی با توجه به میزان بیان بیشتر پروتئین تولیدی در حضور و عدم حضور P19 در بیان موقت نسبت به مطالعات قبلی می‌توان دریافت که این سیستم برای تولید پروتئین tPA مفید می‌باشد. بنابراین اگر در هر گرم وزن تر گیاه، میزان ۱۰ میکروگرم پروتئین tPA بیان گردد با در نظر گرفتن اینکه گیاه رشد مناسب داشته و دارای تعداد برگ‌های قابل تزریق مناسبی نیز باشد، قادر خواهیم بود در مدت زمان کمتر از یک هفته با افزایش تعداد

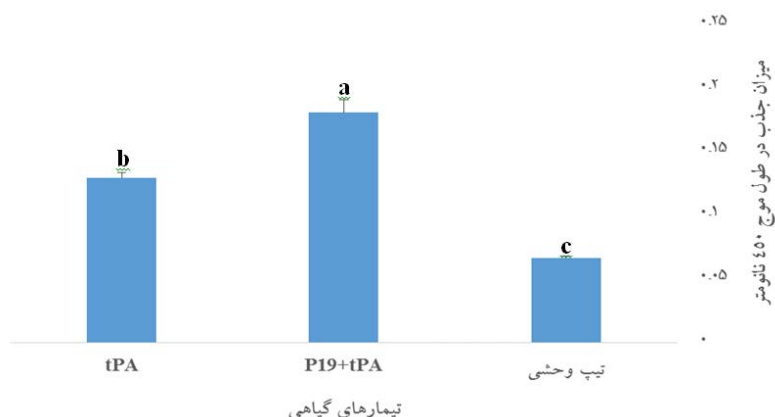
و استفاده از سازه سرکوب‌کننده P19 (حاوی ژن سرکوب‌کننده خاموشی)، یکی دیگر از راهکارها برای افزایش بازده تولید، هدف قرار دادن پروتئین هدف به سمت آپوپلاست و دیگر اجزای سلول است تا در آنجا نگهداری و محافظت شوند (Voinnet *et al.*, 2003). در این آزمایش از یک نوع وکتور برای بررسی بیان پروتئین هدف استفاده شد تا هیچ گونه تفاوتی از نظر محل نگهداری محصول وجود نداشته باشد در نتیجه بتوان تفاوت بیان را به استفاده از سازه سرکوب‌کننده P19 (حاوی ژن سرکوب‌کننده خاموشی) مرتبط دانست.

گیاهان دارای برگ‌های قابل تزریق، با توجه به ویژگی تکرار پذیری بیان موقت، به میزان مورد نیاز از پروتئین tPA دست پیدا کنیم، در مقایسه با انتقال پایدار که میزان تولید تاکنون کمتر بوده و حداقل زمان مورد نیاز برای تولید tPA در روش انتقال ژن به هسته و کلروپلاست حدود شش ماه تا یکسال بوده و همچنین در روش انتقال ژن به هسته تکرارپذیری انتقال نیز امکان‌پذیر نمی‌باشد. پیش بینی می‌شود که افزایش بیان موقت بتواند به راحتی به عنوان یک سیستم بیان سریع و مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در تعداد زیادی از گیاهان به کار برده شود. در کنار استفاده از بیان موقت برای سطح بالاتر بیان



شکل ۵- محصول PCR ژن *tPA* بر روی کلونی‌های آگروباکتریوم رشد کرده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک با آغازگرهای اختصاصی بر روی ژل ۱٪ آگارز. چاهک M: نشانگر مولکولی ۱kb (GeneRuler (Fermentas))، چاهک ۱: کنترل منفی، چاهک ۲: کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن *tPA*)، چاهک‌های ۳ و ۴: محصولات بدست آمده از تکثیر ژن *tPA*

Figure 5- PCR product of *tPA* on *Agrobacterium* colonies grown on media containing antibiotics with specific primers on 1% Agarose gel. M: 1kb standard GeneRuler (Fermentas) Ladder, 1: negative control, 2: Positive control (vector containing *tPA* gene), 3 and 4: products from amplified *tPA* gene.



شکل ۶- میانگین میزان جذب پروتئین گیاهان تراریخته و شاهد در طول موج ۴۵۰ نانومتر.

Figure 6. The average rate of protein absorption at 450 nm in transgenic and control plants.

داده است که در زمان اتصال، P19 دایمر پروتئینی تشکیل می‌دهد که از قسمت انتهایی خود به انتهایی siRNA یا miRNA دو رشته‌ای متصل می‌گردد (Alvarez *et al.*, 2008) و آنها را غیرفعال می‌کند و بدین ترتیب مانع از تشکیل ساختار دو رشته‌ای می‌گردد که عنصر کلیدی محافظت شده در مسیر خاموشی می‌باشند (Burgyán & Havelda, 2011). هم چنین، P19 قادر به اتصال به siRNA دو رشته‌ای بوده و از تشکیل کمپلکس RISC جلوگیری می‌کند. اخیراً مشخص شده است که P19 مانع گسترش و پخش دوپلکس ds siRNA که سیگنال خاموشی هستند می‌گردد (Dunoyer *et al.*, 2004). بنابراین با توجه به انواع مکانیسم عمل سرکوب‌کنندگی خاموشی که توسط P19 صورت می‌گیرد، کاربرد آن برای بهبود بیان موقت پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند مفید باشد، زیرا که تولید و بیان بالای پروتئین نوترکیب در انتقال ژن مورد انتظار است.

بر اساس مطالعات انجام‌شده، مشخص شده است که PTGS بیان موقت ژن به کمک آگروباکتریوم را محدود می‌کند و بررسی‌های انجام شده در این رابطه نشان دادند که می‌توان با بهره‌گیری از پروتئین‌های سرکوب‌کننده خاموشی ژن که توسط ویروس کد گذاری می‌شوند برای محدودیت غلبه نمود (Voinnet *et al.*, 2003). چندین نوع پروتئین سرکوب‌کننده وجود دارند که در بین آنها، P19 موثرتر است (Johansen & Carrington, 2001). پروتئین P19، به عنوان پروتئین سرکوب‌کننده قوی، مکانیسم منحصر به فردی دارد به این ترتیب که به صورت انتخابی به siRNA های ۲۱ و ۲۲ نوکلئوتیدی متصل می‌شود که این اتصال الزاماً بصورت اختصاصی نیست (Arzola *et al.*, 2011) بدین ترتیب که از طریق میل ترکیبی زیادی که با siRNA دو رشته‌ای دارد به آن متصل می‌گردد و آن را تجزیه می‌کند و مانع خاموشی ژن می‌گردد (Burgyán & Havelda, 2011). هم چنین مطالعات نشان

مطالعه ما افزایش تقریباً دو برابر میزان بیان پروتئین tPA را در حضور P19 نشان داد. در مطالعه‌ای Garabagi et al (2012) اعلام کرده‌اند که برای افزایش بیان ژن هدف، نیاز به میزان قابل توجه‌ای (OD600 بیشتر از ۰/۰۲) از P19 برای آلوده سازی *N. benthamiana* و *N. tabacum* می‌باشد و در صورت افزایش میزان P19 (به حدود OD600 ۰/۲)، با کاهش میزان پروتئین نوترکیب روبرو خواهیم شد و علت آن را مرگ سلول و نکروزه شدن بافت ذکر نموده‌اند (Garabagi et al., 2012). در حالی که در این مطالعه، زمانی که انتقال ژن به صورت همزمان با غلظت بالای سرکوب‌کننده خاموشی ژن صورت گرفت، میزان بالاتری از سطح بیان tPA به دست آمد بدون اینکه اثری از نکروزه شدن که نشان دهنده مرگ سلولی است بر روی برگ گیاه توتون (*N. tabacum*) مشاهده شود. نتایج ما نشان داد که کاربرد P19 در بیان موقت پروتئین هدف با سطح بالای بیان همراه بوده است. احتمالاً در عدم حضور این ژن، mRNAهای ژن تراریخت که به میزان زیادی بیان می‌شوند برای تخریب توسط سیستم خاموشی ژن در گیاه هدف قرار داده خواهند شد (Thomas & Walmsley, 2014) و این احتمال وجود دارد که علیرغم کاربرد عناصر موثر در افزایش بیان در طراحی سازه، بدلیل پدیده خاموشی ژن، با کاهش میزان بیان پروتئین نوترکیب روبرو شویم. کاربرد P19 همراه با طراحی سازه‌های حاوی عناصر موثر در افزایش

سرکوب‌کننده P19 به صورت موفقیت آمیزی در سنجش بیان موقت برای افزایش عملکرد چندین پروتئین نوترکیب در جنس *Nicotiana benthamiana* به کاربرده شده است؛ در *N. benthamiana* چندین گزارش از افزایش میزان بیان وجود دارد: در مطالعه Voinnet et al (2003) کاربرد P19 سبب افزایش ۵۰ برابر و حتی بیشتر میزان بیان گردید (Voinnet et al., 2003)، Liu and Kearney (2010) افزایش سطح بیان GFP را در حضور ژن سرکوب‌کننده خاموشی P19 تحت کنترل پروموثر 35S، ۲۵٪ میزان کل پروتئین محلول گزارش نمودند در حالی که در عدم حضور این سرکوب‌کننده میزان بیان تقریباً ناچیز بود (Liu & Kearney, 2010)، Garabagi et al (2012) به افزایش ۱۵ برابر میزان بیان پروتئین نوترکیب دست یافتند (Garabagi et al., 2012) و تزریق همزمان P19 در مطالعه Thomas and Walmsley (2014) سبب گردید که میزان بیان پروتئین سه برابر افزایش یابد (Kirk et al., 2005) اما در توتون (*N. tabacum*) گزارشات بسیار کمی از افزایش میزان بیان وجود دارد، Mohammadzadeh et al (2014) افزایش بیان پروتئین هدف را ۴-۵ برابر گزارش نمودند زمانی که P19 بصورت همزمان با سازه حاوی ژن تزریق گردید، میزان بیان پروتئین نوترکیب از ۰/۰۰۴٪ به ۰/۰۲۲٪ میزان کل پروتئین محلول افزایش یافت (Mohammadzadeh et al., 2014) در حالیکه

بیان می‌تواند برای دستیابی به بیان در سطح بالا پروتئین‌های نوترکیب (هم چون tPA)، در کنار مفید باشد. تحقیق به منظور جداسازی و بررسی بیوشیمیایی پروتئین‌ها، بدون نیاز به استفاده از روش‌های بازرایی زمان‌بر مربوط به تولید گیاهان تراریخت پایدار به کار رود (Voinnet *et al.*, 2003).

با توجه به سادگی و سرعت بیان موقت ژن‌های هدف، انتظار می‌رود که استفاده از P19 به عنوان افزایش‌دهنده میزان بیان برای تولید صنعتی

منابع

- Abdoli-Nasab M, Jalali-Javaran M, Cusidó RM, Palazón J, Baghizadeh A, Alizadeh H (2013). Expression of the truncated tissue plasminogen activator (K2S) gene in tobacco chloroplast. *Molecular Biology Reports* 40: 5749–58.
- Alvarez ML, Pinyerd HL, Topal E, Cardineau GA (2008). P19-dependent and P19-independent reversion of F1-V gene silencing in tomato. *Plant Molecular Biology* 68: 61–79.
- Arzola L, Chen J, Rattanaporn K, Maclean JM, McDonald KA (2011). Transient co-expression of post-transcriptional gene silencing suppressors for increased in planta expression of a recombinant anthrax receptor fusion protein. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 4975–4990.
- Asgari M, Javaran MJ, Moieni A, Masoumiasl A, Abdolinasab M (2014). Production of human tissue plasminogen activator (tPA) in *Cucumis sativus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 44: 182–192.
- Bhaskar PB, Venkateshwaran M, Wu L, Ané JM, Jiang J (2009). Agrobacterium-mediated transient gene expression and silencing: A rapid tool for functional gene assay in potato. *PLoS ONE* 4: 1–8.
- Brodersen P, Voinnet O (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* 22: 268–280.
- Browne MJ, Tyrrell AWR, Chapman CG, Carey JE, Glover DM, Grosveld FG, Dodd I, Robinson JH (1985). Isolation of a human tissue-type plasminogen-activator genomic DNA clone and its expression in mouse L cells. *Gene* 33: 279–284.
- Burgyán J, Havelda Z (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* 16: 265–272.
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642–655.
- Dodd I, Jalalpour S, Southwick W, Newsome P, Browne MJ, Robinson JH (1986). Large scale, rapid purification of recombinant tissue-type plasminogen activator. *FEBS Letters* 209: 13–17.
- Dunoyer P, Lecellier C-H, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell Online* 16: 1235–1250.
- Electricwala A, Atkinson T (1985). Purification and properties of plasminogen activators from epithelial cells. *European Journal of Biochemistry* 147: 511–516.
- Engvall E, Perlmann P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871–874.
- Fann CH, Guirgis F, Chen G, Lao MS, Piret JM (2000). Limitations to the Amplification and Stability of Human Tissue-Type Plasminogen Activator Expression by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnol Bioeng* 2: 204–212.

- Garabagi F, Gilbert E, Loos A, Mclean MD, Hall JC (2012). Utility of the P19 suppressor of gene-silencing protein for production of therapeutic antibodies in *Nicotiana* expression hosts. *Plant Biotechnology Journal* 10: 1118–1128.
- Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, Ruzin S, Jackson AO (2002). pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant Journal* 31: 375–383.
- Goojani HG, Javaran MJ, Nasiri J, Goojani EG, Alizadeh H (2013). Expression and large-scale production of human tissue plasminogen activator (t-PA) in transgenic tobacco plants using different signal peptides. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 169: 1940–51.
- Griffiths JB, Electricwala A (1987). Production of tissue plasminogen activators from animal cells. *Vertebrate Cell Cult. I*. Springer, pp 147–166
- Guy CL, Huber JLA, Huber SC (1992). Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology* 100: 502–508.
- Hahn B-S, Sim J-S, Kim H-M, Ahn M-Y, Pak H-K, Kim N-A, Kim Y-H (2009). Expression and characterization of human tissue-plasminogen activator in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 27: 209–216.
- Hsieh Y-C, Omarov RT, Scholthof HB (2009). Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the Tomato bushy stunt virus p19 silencing suppressor. *Journal of Virology* 83: 2188–2200.
- Jalanko A, Pirhonen J, Pohl G, Hansson L (1990). Production of human tissue-type plasminogen activator in different mammalian cell lines using an Epstein-Barr virus vector. *Journal of Biotechnology* 15: 155–168.
- Johansen LK, Carrington JC (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiology* 126: 930–938.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M, Angenon G (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant science* 122: 101–108.
- Kirk DD, McIntosh K, Walmsley AM, Peterson RKD (2005). Risk analysis for plant-made vaccines. *Transgenic Research* 14: 449–462.
- Levin EG, Santell L, Osborn KG (1997). The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *Journal of Cell Science* 148: 139–148.
- Lindbo J a (2007). High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC biotechnology* 7: 52.
- Liu Z, Kearney CM (2010). A tobamovirus expression vector for agroinfection of legumes and *Nicotiana*. *Journal of Biotechnology* 147: 151–159.
- Maclean J, Koekemoer M, Olivier a. J, Stewart D, Hitzeroth II, Rademacher T, Fischer R, Williamson a. L, Rybicki EP (2007). Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: Comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *Journal of General Virology* 88: 1460–1469.
- Masoumi Asl A, Mahboudi F, Alizadeh H (2010). Cloning and expression of tissue plasminogen activator (t-pa) gene in tobacco plants. *Scientific Research and Essays* 5: 917–922.
- Mohammadzadeh S, Khabiri A, Roohvand F, Memarnejadian A, Hatef Salmanian A, Ajdary S, Ehsani P (2014). Enhanced-Transient Expression of Hepatitis C Virus Core Protein in *Nicotiana tabacum*, a Protein With Potential Clinical Applications. *Hepatitis Monthly* 14: e20524.

- Obukowicz MG, Gustafson ME, Junger KD, Leimgruber RM, Wittwer AJ, Wun TC, Warren TG, Bishop BF, Mathis KJ (1990). Secretion of active kringle-2-serine protease in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 29: 9737–9745.
- Omar A (2013). Effect of a silencing suppressor gene towards the expression of VP2 protein of highly virulent infectious bursal disease virus in tobacco. *Journal of Bioscience and Biotechnology* 2: 159–166.
- Park J-W, Faure-Rabasse S, Robinson MA, Desvoyes B, Scholthof HB (2004). The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology* 323: 49–58.
- Rouf S a., Moo-Young M, Chisti Y (1996). Tissue-type plasminogen activator: Characteristics, applications and production technology. *Biotechnology Advances* 14: 239–266.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 6: 4–6.
- Soleimani M, Davudi N, Fallahian F, Mahboudi F (2006). Cloning of Tissue Plasminogen Activator cDNA in Nonpathogenic *Leishmania*. *Yakhteh Medical Journal* 8: 196–203.
- Thomas DR, Walmsley AM (2014). Improved expression of recombinant plant-made hEGF. *Plant Cell Reports* 33: 1801–1814.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33: 949–956.
- Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 3: 259–73.

Enhanced expression of tissue plasminogen activator via gene silencing suppressor strategy using P19 protein

Amiri M.¹, Jalali-Javaran M.*², Ehsani P.³, Haddad R.⁴

¹ PhD Student of Plant Breeding, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran.

² Associate professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares (TMU) university, Tehran, Iran.

³ Assistant Professor, Department of Molecular Biology, Pasteur Institute of Iran (IPI), Tehran, Iran.

⁴ Associate professor, Department of Agricultural Biotechnology, Qazvin, Iran.

Abstract

Human tissue-type plasminogen activator (tPA) is one of the most important therapeutically proteins involved in the breakdown of blood clots of brain and heart blood vessels following stroke. Therefore, several modern approaches in plant biotechnology such as nuclear and chloroplast transformation have been used to produce the valuable protein. Plant transient expression is a rapid, flexible and reproducible approach to obtain high-level of expression of valuable recombinant pharmaceutical proteins. It is shown that post-transcriptional gene silencing (PTGS) process influences the expression level. Therefore, the effect of co-expression of gene silencing suppressor gene P19, derived from tomato bushy stunt virus (TBSV), has been studied on transient expression of tPA in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. To serve this purpose, the expression proportion of injected *Agrobacterium tumefaciens* containing a binary vector pTRAc-tPA-ERH with *Agrobacterium* containing pCambia-P19 have been studied comparison with the expression level from *Agrobacterium* containing only the binary vector pTRAc-tPA-ERH. ELISA results from co-agroinjection experiments have shown that the expression level of tPA using p19 was 10µg/g of leaf fresh weight, which this expression level was about two times more than that from leaves injected with *Agrobacterium* without the vector harboring p19. Therefore, comparing to the stable transformation which needs more time to produce the protein, in transient expression, depends on the number of the injectable leaves per plant and production of 10µg of tPA per gram leaf fresh weight, a higher level of expression can be achieved less than one week. In conclusion, it seems transient expression could be utilized to express tPA usefully and the expression level could ameliorate using virus coded gene silencing suppressor to achieve the expression proportion of 10µg/g of leaf fresh weight.

Key words: *Nicotiana tabacum*, transient gene expression, tissue plasminogen activator (tPA), post-transcriptional gene silencing (PTGS), gene silencing suppressor

* Corresponding Author: Jalali-Javaran M. Tel: +9802148292104

Email: jalali.mokhtar@gmail.com